蝶と蛾 *Lepidoptera Science* **66** (1): 26–42, May 2015

雌雄交尾器とDNAバーコーディングに基づくミカドアゲハ日本産亜種の再検討，特に沖縄島と対馬個体群の所属について

長田庸平[1)]・矢後勝也[2)]・矢田　脩[3)]・広渡俊哉[4)]

[1)] 812-8581 福岡県福岡市東区箱崎6-10-1 九州大学大学院生物資源科学学府昆虫学教室
[2)] 113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1 東京大学総合研究博物館
[3)] 812-8581 福岡県福岡市東区箱崎6-10-1 九州大学総合研究博物館
[4)] 812-8581 福岡県福岡市東区箱崎6-10-1 九州大学大学院農学研究院昆虫学教室

Comparison of the male and female genitalia and DNA barcoding between Japanese subspecies of *Graphium doson* (C. Felder & R. Felder) (Lepidoptera, Papilionidae), with determination of the subspecies of the Okinawa-jima and Tsushima Island populations

Yohei OSADA[1)], Masaya YAGO[2)], Osamu YATA[3)] and Toshiya HIROWATARI[4)]

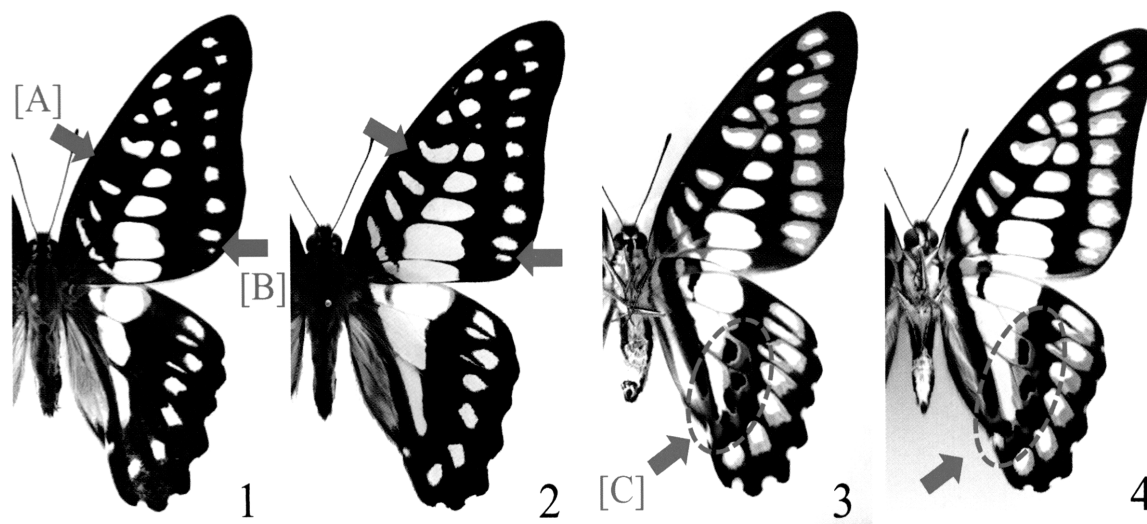
[1)] Entomological Laboratory, Graduate School of Bioresource and Bioenvironmental Sciences, Kyushu University, 6-10-1 Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka, 812-8581 Japan
[2)] The University Museum, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-0033 Japan
[3)] The Kyushu University Museum, 6-10-1 Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka, 812-8581 Japan
[4)] Entomological Laboratory, Faculty of Agriculture, Kyushu University, 6-10-1 Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka, 812-8581 Japan

Abstract The subspecific classification of Japanese *Graphium doson* (C. Felder & R. Felder, 1864) into ssp. *albidum* (Wileman, 1903), spp. *perillus* (Fruhstorfer, 1908), and ssp. *tsushimanum* Fujioka, 1981 is reviewed based on the genital morphology and the DNA barcode sequences (655 bp of *COI*). In particular, the population of Okinawa-jima (Okinawa Islands), the subspecific status of which has not yet been clarified, is assigned to ssp. *albidum* (Wileman, 1903). In addition, the population of Tsushima Island, which has sometimes been regarded as an independent subspecies, is concluded to belong within ssp. *albidum*.

Key words distribution, evergreen broad-leaved forests, larval food plants, spp. *albidum*, spp. *perillus*, warm-temperate zone, wing markings.

はじめに

アオスジアゲハ属*Graphium*（アゲハチョウ科Papilionidae）は，日本に広く分布するアオスジアゲハ*Graphium sarpedon* (Linnaeus, 1758)を含め世界で約100種に及ぶ数多くの種が知られている（Parsons, 1998; スミス, 2006）．この内，ミカドアゲハ*Graphium doson* (C. Felder & R. Felder, 1864)，*G. arycles* (Boisduval, 1836)，*G. meyeri* (Hopffer, 1874)，*G. bathycles* (Zinken, 1831)，*G. chironides* (Wallace, 1865)，*G. leechi* (Rothschild, 1895)，*G. eurypylus* (Linnaeus, 1758)，*G. evemon* (Boisduval, 1836)，*G. procles* (Grose-Smith, 1887)の9種が*eurypylus*種群としてグルーピングされている（三枝ら，1977; Saigusa *et al*., 1982）．本種群のミカドアゲハ（以下，本種）はスリランカ・インド・マレーシア地域を中心に台湾から西南日本まで分布し，約13～15の亜種が認められていたが（三枝ら，1977; 塚田・西山, 1980; 藤岡, 1997; 矢田, 2007），最近，Page and Treadaway (2014)によって2新亜種を含む21亜種に分類された．

本種は国内からは，本州西南部，四国南部，九州，対馬，屋久島，種子島，奄美諸島に生息する本土亜種*Graphium doson albidum* (Wileman, 1903)と，石垣島，西表島などに生息する八重山亜種*Graphium doson perillus* (Fruhstorfer, 1908)の2亜種が知られている（猪又ら, 2013）．両亜種間では成虫の翅表の斑紋の色彩が異なり，本土亜種はクリーム色から淡青色であるが，八重山亜種は青緑色である（白水，1965）．沖縄島産に関しては，藤岡（1972）は本土亜種に含めたが，その後，藤岡（1975）は色彩の青味から八重山亜種に変更した．塚田・西山（1980）は沖縄島産を本土亜種に含めたが，藤岡（1981）は八重山亜種のまま扱った．なお，藤岡（1981）は，対馬産が小型で後翅裏面の赤紋が小さいことに基づいて独立亜種ssp. *tsushimanum* Fujioka,

Figs 1-4. Two Japanese subspecies of *G. doson*. 1, 3: *G. doson albidum* (Kochi Pref., Shikoku). 2, 4: *G. doson perillus* (Ishigaki-jima, Ryukyus). 1, 2: Upperside. 3, 4: Underside.

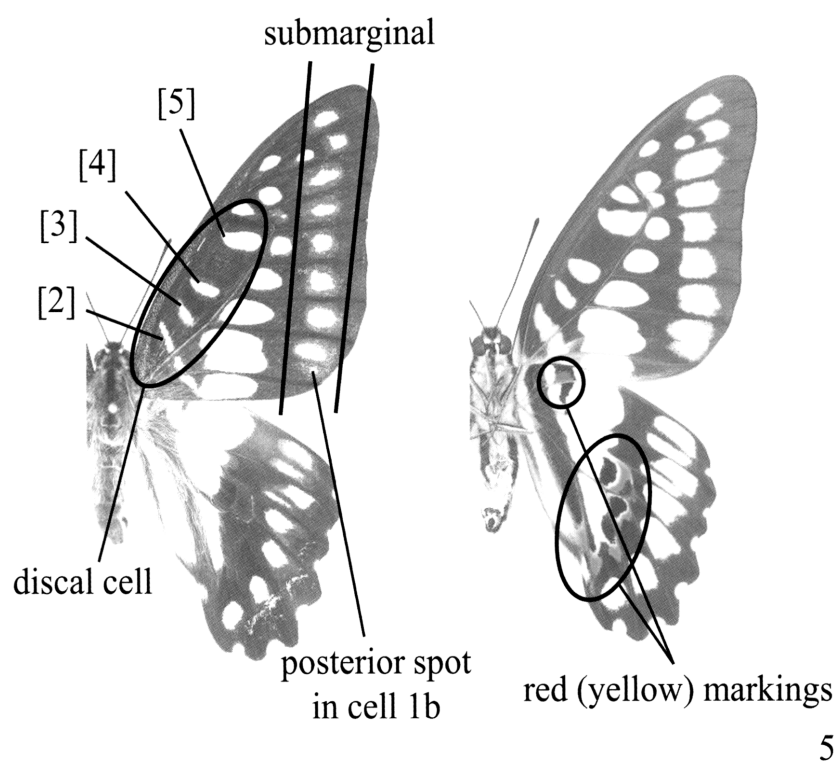



Fig. 5. Wing pattern element nomenclature used in this paper (after Smith and Vane-Wright, 2001).

1981とした．その後，日高（1984）は沖縄島産を八重山亜種と扱った．しかし，猪又（1986）は日本産を本土～奄美亜種，対馬亜種，沖縄・八重山亜種の3亜種に区分することに加え，沖縄島産と八重山諸島産は後翅裏面の赤斑や基部付近の黒色短帯により区別できるが，奄美諸島産の標本が不足しているとして沖縄島産の独立性を保留し，対馬産の亜種分割に関しても更なる再検討が必要と指摘した．なお，猪又（前出）の英文目録では，沖縄島産を本土亜種に含めている（里中，2014）．その後，猪又（1990）および猪又・松本（1995）は沖縄島産を八重山亜種とした．藤岡

(1997) は国内に本土～奄美亜種，対馬亜種，沖縄・八重山亜種の3亜種を認め，沖縄島産は色彩に青みが強く，第2化個体の発生数が少なくないことに基づいて八重山諸島産に近いと見なし，奄美大島と沖縄島の間に亜種区分の線を引くべきとしている．ただし，藤岡 (1997) が奄美諸島産として図版編と資料編に出している標本は，奄美諸島産ではなく沖縄島産としてデータが示されている (福田, 2012)．東ら (2002) は沖縄島産を本土亜種に含め，さらに東 (2005) は沖縄島を本土亜種の南限と考え，沖縄島において「絶滅のおそれのある地域個体群」としている．一方，白水 (2006) は沖縄島産を八重山亜種として扱い，対馬産を本土亜種に含めた．その後，青木ら (2009) は，沖縄島産は青みが強いものの本土亜種に含まれるとしているが，具体的な根拠を示していない．最近では，蛭川 (2013) も沖縄島産を八重山亜種としている．最近の「日本昆虫目録」では，猪又ら (2013) は本土亜種と八重山亜種の2亜種を認め，対馬および沖縄島までの南西諸島の個体群を本土亜種に含めている．このように，沖縄島産本種の亜種の所属に関しては現在も不明確である．また，対馬産の独立性も充分に議論されていない．

斑紋パターンに関しては，野林 (1998) により本州～沖縄島産と八重山諸島産で異なることが示されている．すなわち，彼は前翅中室にある4つの斑紋 ([A])や前翅亜外縁1b室の後方の斑紋 ([B]) (Figs 1-2)，後翅裏面の赤色斑 ([C]) (Figs 3-4)にそれぞれ安定した差異を示している．ただし翅斑の色彩に関しては，沖縄島産の色彩は青みが強くて八重山諸島産に近いとしている．

国内における本種の幼虫の主な寄主植物は，本州～沖縄本島ではモクレン科Magnoliaceaeのオガタマノキ*Michelia compressa* (Maxim.) Sarg.やタイサンボク*Magnolia grandiflora* L.であり，八重山諸島ではモクレン科のタイワンオガタマノキ*Michelia compressa* var. *formosana* Kaneh.である (福田, 2012)．

以上述べたように，本種は本州～沖縄島産と八重山諸島産で翅の斑紋や生態的特徴が異なっていることが示唆されているが，種や亜種の識別に有用とされる雌雄交尾器の形態の変異は報告されていない．

そこで著者らは，日本各地と国外の個体を用いて，本種成虫の翅の斑紋の色彩および雌雄交尾器の形態の比較検討およびDNAバーコード領域を解析した．これらの結果に基づいて日本産の亜種とその分布域を再検討するとともに，亜種の所属が不明確であった沖縄島産の亜種帰属および対馬産の独立性について考察した．

材料および方法

形態比較および分子系統解析は，九州大学農学部，九州大学総合研究博物館，九州大学大学院比較社会文化研究院，大阪府立大学生命環境科学部，東京大学総合研究博物館の所蔵標本，著者らが採集した標本および個人所有の標本を用いて行った．

1. 斑紋および交尾器形態

翅の斑紋および交尾器形態の比較に供した標本の産地と個体数は以下の通りである (カッコ内は交尾器の観察に用いた個体数)：三重県伊勢市 1♂1♀ (1♂)，和歌山県那智勝浦町2♀ (2♀)，和歌山県串本町 2♂2♀ (1♂)，高知県高知市2♂2♀ (2♂1♀)，高知県香美市1♂1♀，山口県萩市1♂ (1♂)，長崎県対馬 4♂3♀ (2♂3♀)，福岡県福岡市5♂3♀ (3♂3♀)，熊本県熊本市1♂ (1♂)，宮崎県高鍋町1♂1♀ (1♂1♀)，鹿児島県鹿児島市2♂ (1♂)，鹿児島県屋久島3♂1♀ (2♂1♀)，奄美大島4♂4♀ (2♂2♀)，沖縄県国頭村6♂ (5♂)，大宜味村10♂5♀ (5♀)，石垣島8♂5♀ (5♂5♀)，西表島4♂2♀ (2♂2♀)，台湾 (ssp. *postianus* (Fruhstorfer, 1902)) 8♂2♀ (4♂2♀)，中国香港 2♂2♀ (2♂2♀) (ssp. *axionides* (C. Felder & R. Felder, 1864))．

雌雄交尾器は，切断した腹部を10% KOHで約15分間煮沸して，その後水洗した材料を用いた．雄交尾器は右のvalvaを取り外し，Canada Balsamを用いてプレパラートに封入した．雄交尾器のventral harpeに関しては，harpeの基部の長さを*a*，ventral harpeの長さを*b*として，*a*/*b*を各地の個体ごとに算出してグラフを作成した．雌交尾器のcentral lobeは採集地ごとに長さを計測してグラフを作成した．

斑紋の名称はSmith and Vane-Wright (2001)のFig. 8に(Fig. 5)，また雌雄交尾器の各部位の名称はSmith and Vane-Wright (2001)のFigs 10, 13に従った．

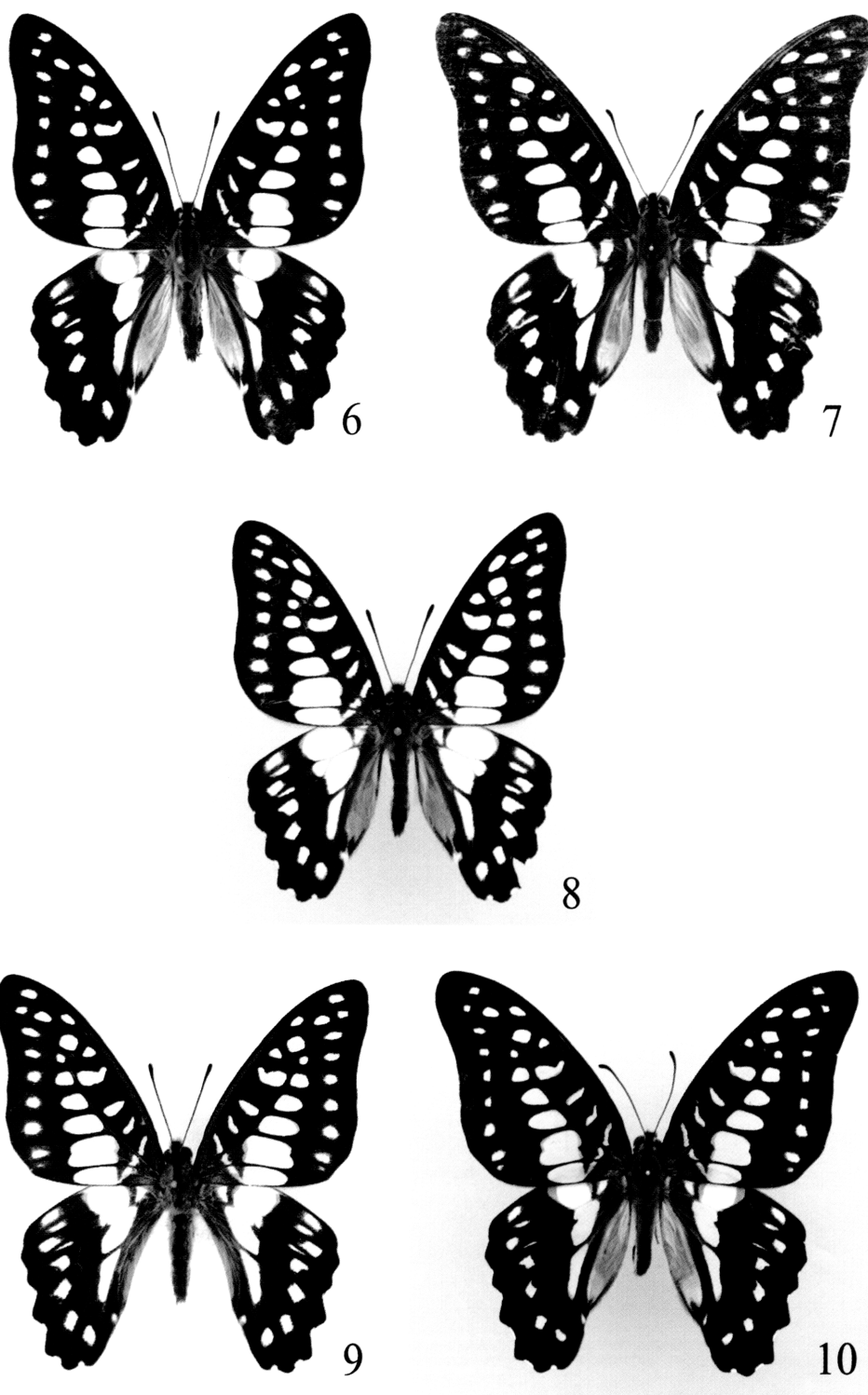
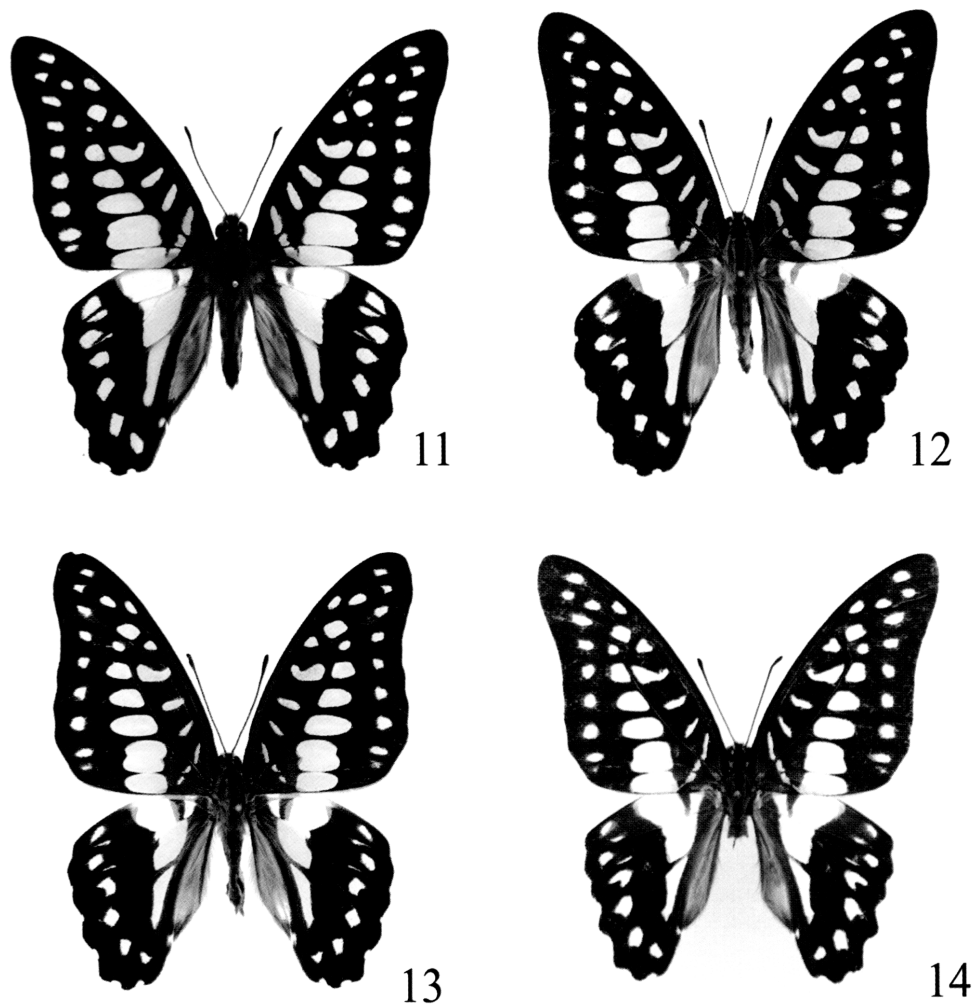
2. 分子系統解析

1) 材料および解析方法

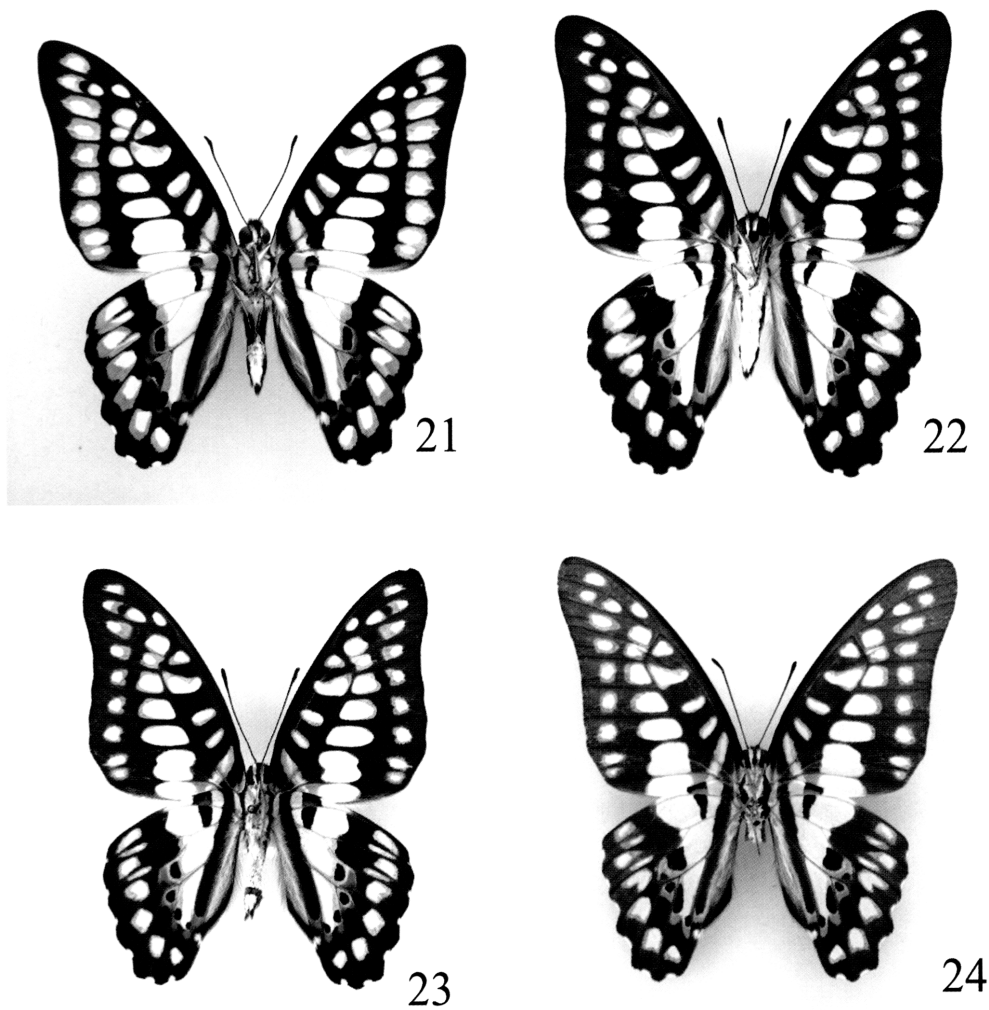
遺伝子解析はそれぞれの地域材料について99%エタノール液浸にした幼虫の腹部および成虫の中脚(あるいは両者を)を1.5 mlチューブに入れてすり潰し，DNeasy Tissue Kit (Qiagen)を用いて全DNAを抽出した．その後，Brown *et al.* (1994)によって，種間や亜種間の関係を探るのに適切とされているミトコンドリア*COI*領域の一部(655 bp)をPCR法によって増幅した．プライマーの組み合わせは，DNAバーコーディングでよく使われるFolmer *et al.* (1994)のuniversal primer，LCO1490 (fwd) (5'-GGT CAA CAA ATC ATC ATA AAG ATA TTG G-3')と HCO2198 (rev) (5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3')を使用した．PCR反応・PCR精製・サイクルシークエンス反応・ヒートショックはTaKaRa PCR Thermal Cycler Diceを使用した．PCR反応は，各DNAテンプレート1.0 μL，各プライマー 0.5 μL，蒸留水MilliQ 6.2 μL，10×ExTaq Buffer 1.0 μL，dNTP Mixture 0.8 μL，ExTaq 0.05 μLを混合した約10.0 μLにて，増幅プログラムは94℃ 2分の前処理後，94℃ 1分，48℃ 1分30秒，72℃ 1分30秒の反応を35サイクル行った．PCR精製には，約6.0 μLのPCR産物にExo-Sap 0.8 μLを添加し，37℃ 31分，80℃ 15分を1サイクル行った．サイクルシークエンス反応は，各DNAテンプレート1.0 μL，各プライマー 0.5 μL，蒸留水MilliQ 2.67 μL，Dilution Buffer 0.75 μL，Big Dye ver. 3.1 Mix 0.5 μLを混合した約5.0 μLの溶液にて，増幅プログラムは94℃ 30秒の前処理後，96℃ 30秒，50℃ 4分50秒の反

Table 1. *Graphium* taxa used in molecular phylogenetic analyses and their GenBank accession numbers.

Species or subspecies name	Sample name	Locality	GenBank Accession No.
In group			
G. doson albidum	Wakayama	Tanabe-shi, Wakayama Pref., Honshu, Japan	LC008351
	Tokushima	Minami-cho, Tokushima Pref., Shikoku, Japan	AB923913
	Kochi1	Kami-shi, Kochi Pref., Shikoku, Japan	AB923914
	Kochi2	Kami-shi, Kochi Pref., Shikoku, Japan	AB981023
	Tsushima	Tsushima-shi, Nagasaki Pref., Tsushima Is., Japan	LC008349
	Fukuoka1	Minami-ku, Fukuoka-shi, Fukuoka Pref., Kyushu, Japan	AB923915
	Fukuoka2	Chuo-ku, Fukuoka-shi, Fukuoka Pref., Kyushu, Japan	LC008350
	Fukuoka3	Higashi-ku, Fukuoka-shi, Fukuoka Pref., Kyushu, Japan	AB981025
	Kagoshima	Kagoshima-shi, Kagoshima Pref., Kyushu, Japan	AB981024
	Yaku-shima	Yaku-shima, Osumi Islands, Japan	AB923916
	Amami-oshima	Amami-oshima, Amami Islands, Japan	LC005611
	Okinawa-jima1	Ogimi-son, Okinawa-jima, Okinawa Islands, Japan	AB923917
	Okinawa-jima2	Ogimi-son, Okinawa-jima, Okinawa Islands, Japan	AB981026
	Okinawa-jima3	Ogimi-son, Okinawa-jima, Okinawa Islands, Japan	AB981027
	Okinawa-jima4	Ogimi-son, Okinawa-jima, Okinawa Islands, Japan	AB981028
	Okinawa-jima5	Ogimi-son, Okinawa-jima, Okinawa Islands, Japan	LC005612
	Okinawa-jima6	Ogimi-son, Okinawa-jima, Okinawa Islands, Japan	LC005613
G. doson perillus	Ishigaki-jima1	Ishigaki-jima, Yaeyama Islands, Japan	AB923918
	Ishigaki-jima2	Ishigaki-jima, Yaeyama Islands, Japan	AB923919
	Ishigaki-jima3	Ishigaki-jima, Yaeyama Islands, Japan	AB981029
	Iriomote-jima1	Iriomote-jima, Yaeyama Islands, Japan	AB923920
	Iriomote-jima2	Iriomote-jima, Yaeyama Islands, Japan	AB923921
G. doson postianus	Taiwan1	Ren-ai, Nantou, Taiwan	AB923922
	Taiwan2	Ren-ai, Nantou, Taiwan	AB981030
	Taiwan3	Taichung, Taiwan	AB923923
G. doson evemonides	Malaysia	Malaysia	KC970123*
G. meyeri	Sulawesi	Sulawesi, Indonesia	AB981031
G. eurypylus acheron	China	Guangdong, China	AB981032
G. eurypylus pamphylus	Sulawesi	Sulawesi, Indonesia	AB981033
G. arycles	Malaysia	Malaysia	KC970109*
G. evemon	Malaysia	Malaysia	KC970125*
G. bathycles	Malaysia	Malaysia	KC970115*
G. chironides	-	-	HM246463**
Out-groups			
Graphium cloanthus	Pakistan	Pakistan	KC158380*
Lamproptera meges	Malaysia	Malaysia	KC970136*

* After Wilson et al. (2013)
** Unpublished

Figs 6-10. Upperside of subspecies of *Graphium doson* male. 6: Kochi Pref., Shikoku (Diapausing). 7: Kagoshima Pref., Kyushu (Nondiapausing). 8: Tsushima Island. 9: Okinawa-jima, Okinawa Islands (Diapausing). 10: Okinawa-jima, Okinawa Islands (Nondiapausing).

Figs 11-14. Upperside of subspecies of *Graphium doson* male. 11: Ishigaki-jima, Yaeyama Islands (Diapausing). 12: Ishigaki-jima, Yaeyama Islands (Nondiapausing). 13: Taiwan. 14: Hong Kong, China.

応を30サイクル行った．その後，シークエンス産物に3mol酢酸ナトリウム1.5 μLと99.5%エタノール13.5 μLを加え15分常温で放置した．遠心機を用いて15,000rpmで10分間遠心し，上澄みを棄て70%エタノール50 μLを加えて15,000rpmで5分間遠心し上澄みを棄て，90-95℃で2分間熱乾させた．そして，Hi-Di Formamide 10 μLを加え，ヒートショック（94℃を1サイクル）を行い，氷の上に移した．そのシークエンス産物を96ウェルに移し，ABI3100 automatic sequencerを用いてダイレクトシークエンスにより塩基配列を決定した．アラインメントにはMEGA5.2 (Tamura *et al*., 2011)を用いた．

Figs 15-20. Underside of adult specimens. 15: Kochi Pref., Shikoku (Diapausing, Yellow type). 16: Kagoshima Pref., Kyushu (Nondiapausing, Yellow type). 17: Kochi Pref., Shikoku (Diapausing, Red type). 18: Tsushima Island. 19: Okinawa-jima, Okinawa Islands (Diapausing). 20: Okinawa-jima, Okinawa Islands (Nondiapausing).

Figs 21-24. Underside of adult specimens. 21: Ishigaki-jima, Yaeyama Islands (Diapausing). 22: Ishigaki-jima, Yaeyama Islands (Nondiapausing). 23: Taiwan. 24: Hong Kong, China.

Figs 25-26. Female specimen with yellowish white markings of *G. doson perillus* from Iriomote-jima, Yaeyama Islands. 25: Upperside. 26: Underside.

2) 分子系統解析

上記の方法により得られた日本産および台湾産ミカドアゲハ，*G. eurypylus acheron* (Moore, 1885)，*G. eurypylus pamphylus* (C. Felder & R. Felder, 1865)，*G. meyeri*のミトコンドリアDNAの*COI*領域の塩基配列データに加えて，東南アジアの*eurypylus*種群各種・各亜種 [*G. doson evemonides* (Honrath, 1884), *G. chironides*, *G. bathycles*, *G. arycles*, *G. evemon*]，および外群としてのタイワンタイマイ*Graphium cloanthus* Westwood, 1881とスソビキアゲハ*Lamproptera meges* (Zinken-Sommer, 1831) の*COI*領域の塩基配列のデータをGenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/)より引用して次の方法で解析した．遺伝子解析に用いた標本の産地およびGenBank accession numbersより引用した種はTable 1に示した．MEGA5.2 (Tamura *et al.*, 2011)を用いて近隣結合法 [Neighbor-joining method (NJ)]および最尤法 [Maximum-likelihood (ML)]により系統樹を作成した．NJではKimura 2パラメーターモデルを使用し，ブートストラップ解析は10,000回を試行した．MLでは最適モデルとしてHKYモデルを選択し，ブートストラップ解析は1,000回を試行した．

結果

1. 翅の斑紋の比較

成虫の翅の斑紋について比較した結果，以下の傾向が認められた．

1) 前翅表面中室の4個の斑紋[2]~[5]において，本州～沖縄島産では斑紋[4]と斑紋[5]の間隔がその他の斑紋の間隔よりも広く開いているが (Figs 6-10)，八重山諸島産では4個の斑紋の間隔はほぼ均しい (Figs 11-12).

2) 前翅表面の1b室にある亜外縁列最後方の斑紋は，本州～沖縄島産 (Figs 6-10)に比べて八重山諸島産 (Figs 11-12)ではより大きく発達する．

3) 後翅裏面の赤色斑（黄色斑）は，八重山諸島産 (Figs 21-22)に比べて本州～沖縄島産 (Figs 15-20)では大きく発達する．ただし，例外的に対馬産は狭い (Fig. 18).

4) 翅表の斑紋の色彩は，本土産はやや青味がかったクリーム色 (Figs 6-8)で，沖縄島産は本土産と比較して青色の色調が強く(Figs 9-10)，八重山諸島産は本土産や沖縄島産と比較しても青色の色調がさらに強い (Figs 11-12).

以上の諸点の相違によって，本州～沖縄島産と八重山諸島産は区別できる．これは，野林 (1998)の指摘と一致していた．ただし，色彩の青味は南下するにつれてクライン的に変異する傾向がうかがえるが，斑紋パターンにはクライン的な変異は認められなかった．沖縄島産の夏型には八重山産のように青味の強い個体も出現するが，斑紋パターンは通常の本土亜種の特徴を現わしている (Figs 10, 20)．なお，八重山諸島では青色型に加えて黄白色型も知られているが，色彩が異なるだけで斑紋パターンは通常の八重山亜種の特徴を現わしている (Figs 25-26)．さらに，台湾亜種*postianus*の色彩や斑紋は八重山亜種 *perillus*とほぼ共通していたが，前翅亜外縁1b室のposterior spotはより小さく(Fig. 13)，後翅裏面の赤斑はより広く顕著であり (Fig. 23)，中国大陸亜種*axionides*は色彩や斑紋は台湾亜種に似るが，より小型である (Figs 14, 24).

2. 交尾器形態の比較

1) 雄交尾器 (Figs 27-38)

雄交尾器のuncus，vinculum，tegumenには，安定的な地理的変異は確認できなかった．しかし，valva内側のventral harpeやaedeagusには安定的な地理的変異が確認された．Ventral harpeは，本土産 (Fig. 27)，対馬産 (Fig. 29)および沖縄島産 (Fig. 31)では八重山諸島産 (Fig. 33)に比べてやや太くて長めであった．台湾産では突出が本土亜種よりも小さく (Fig. 35)，八重山亜種の特徴に近い傾向が見られ，白水 (1960)が示した特徴とほぼ一致した．中国香港産も八重山亜種や台湾亜種の特徴に近い (Fig. 37)．これらの形質の特徴は同一集団内では安定している (Fig. 39)．Aedeagus腹面の先端は，本土産 (Fig. 28)，対馬産 (Fig. 30)および沖縄島産 (Fig. 26)ではやや右方向に曲がっているのに対し，八重山諸島産 (Fig. 34)では真っ直ぐであった．台湾亜種 (Fig. 36)や中国大陸亜種 (Fig. 38)のaedeagusの先端も直線的であり，八重山亜種の特徴により近かった．

2) 雌交尾器 (Figs 40-49)

Central lobeは，本州～沖縄本島産 (和歌山県産: Fig. 40, 対馬産: Fig. 41, 奄美大島産: Fig. 42, 沖縄島産: Fig. 43)に比べて，八重山諸島産 (石垣島産: Figs 44-45, 西表島産: Figs 46-47)および台湾産 (Fig. 48)，中国香港産 (Fig. 49)の方が長く，安定的な地理的変異を確認した (Fig. 50)．一方，central lobeの太さや先端の分岐の程度に関しては，地理的変異よりもむしろ個体変異の幅が大きかった．

3. 分子系統解析

亜種間の塩基置換率は0.46~0.76 % (3~5/655 bp)であった．また，本土～沖縄島および対馬産では0~0.15 % (0~1/655 bp)，八重山産では0~0.15 % (0~1/655 bp)の塩基置換率が確認された．台湾亜種と比較すると，台湾亜種と八重山産は0.46~0.61 % (3~4/655 bp)，台湾亜種と本土～沖縄島産は0.61~0.76 % (4~5/655 bp)の塩基置換率が確認された．なお，これらのシーケンスの挿入・欠失は確認できなかった．

近隣結合法および最尤法による分子系統樹をFigs 51-52に示した．いずれの解析法でもミカドアゲハの単系統性は強く支持されたが，亜種間の遺伝的距離は小さく，分岐関係を示すブートストラップ値が低く，系統関係についてはやや不明確な結果が得られた．なお，沖縄島産は*albidum*のクレードに含まれた．また，マレー半島亜種 *evemonides*は日本産2亜種や台湾亜種とは異なったクレードに位置した．

考察

1. 日本産2亜種の再検討

ここまでの比較形態学的研究による結果をTable 2に示した．前述のように，翅の斑紋パターンは野林（1998）の指摘した通りであった．すなわち，本土亜種の翅表斑紋の色彩の青味は南下するにつれてクライン的に変異している傾向が認められるが，本州～沖縄島産と八重山諸島産は斑紋パターンにクライン的ではない安定的な形態的差異が認められ，斑紋により識別可能であることが分かった．これら成虫の斑紋の差異に加えて，雌雄交尾器の形態的特徴および遺伝子解析により，日本列島のミカドアゲハの2亜種 *albidum*と *perillus*は，それぞれ異なった個体群であることが今回確認された．以上の結果より，これまで亜種の所属に異論のあった沖縄島産は，藤岡(1972)，塚田・西山(1980)，東ら（2002），青木ら（2009）および猪又ら（2013）の指摘通りに，本土亜種*albidum*に帰属するのが妥当であると考えられる．さらに，藤岡（1981, 1997）や猪又（1986）によって独立亜種*tsushimanum*と扱われたことがある対馬産は，裏面の赤斑が狭いという特徴があるが，その他の斑紋パターン・雌雄交尾器・遺伝子情報により，猪又ら（2013）のように本土亜種の地理的変異とみなすべきであるという結論に達した．2亜種の国内における分布図をFig. 53に示した．川副・若林（1976）が図示した本種の交尾器は，雄のaedeagusや雌のcentral lobeの形状から判断すると本土亜種の特徴と一致する．

なお，*Graphium*属の翅の青色の斑紋を現わす青色ビリン色素の特徴は，ミカドアゲハ両亜種間（本州産と石垣島産）で異なっている（加藤・山田, 2010)．生態的な面に関して，幼虫の主な食餌植物が本土産亜種*albidum*ではオガタマノキおよびタイサンボクであり，八重山亜種 *perillus*ではタイワンオガタマノキであるように亜種間で異なっている．本種の化性については，福田（2012）によると，本土亜種は，高知県などで見られる稀な例（濱田, 2010）を除けば年1化の春型のみの発生を基本とし，第2化以降の夏型の発生が見られてもその個体数は少なく，第1化の子世代の多くは夏季から翌春まで長期間を蛹で休眠する．一方，八重山亜種は温暖期にはほぼ連続的に成虫が発生を繰り返し，冬は蛹で越冬していると言われる．このように，今回の形態学的研究の結果とともに，斑紋の色素および寄主植物や休眠性など生態的な面でも亜種間で異なることが示唆されている（Table 2)．今後は，*Graphium*属のより多くの種や亜種を用いた斑紋の色素成分の解析とその比較，更に飼育実験による幼虫の寄主植物の選好性や蛹の休眠性の比較などの調査が望まれる．

2. 海外産との比較

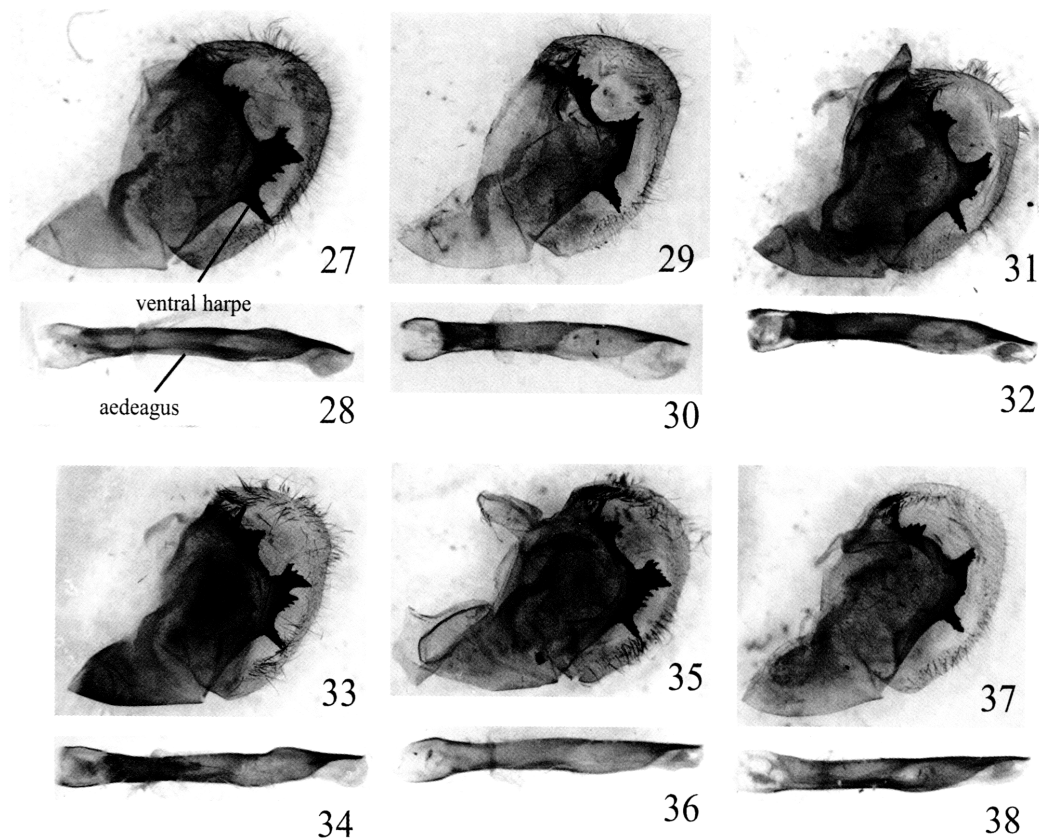
*COI*領域による系統解析の結果を見ると，ミカドアゲハが属する*Graphium*亜属の*eurypylus*種群の単系統性は，Makita *et al.* (2003)によって示された核DNAの28SrDNA と*mt*DNAの*ND5*領域による解析結果と同様に高いブートストラップ値で支持されたことから，形態に基づいて提唱された本種群の単系統性は分子でもさらなる裏付けが得られた．

*Graphium eurypylus*種群の中には，*G. bathycles*や*G. chironides*, *G. meyeri*など多くの異所的種分化が推測されるだけでなく，広域分布種のミカドアゲハも多数の亜種が知られている（三枝ら, 1977; Saigusa *et al.*, 1982; 三枝, 2003)．本種群の多くの近似種や亜種が東南アジアの熱帯域で繁栄している中で，ミカドアゲハ本土亜種*albidum*は温帯域に限って生息し，加えて翅表の色彩も淡色化して生態的な面でも異なることから，本亜種は温帯域に適応して異所的な分化を遂げた特殊な個体群であると推測された．この点から本亜種は日本列島の暖温帯の常緑広葉樹林に生息する貴重な個体群ともいえる．一方，本研究では台湾亜種*postianus*も解析したが，この亜種は斑紋や交尾器の形態的特徴が八重山亜種*perillus*にやや類似しているが，日本の2亜種とは遺伝的に異なった個体群であることが示された．この結果は，青木ら (2009)が指摘するように，八重山亜種*perillus*も八重山諸島固有の個体群であることが支持された．

海外ではSmith and Vane-Wright (2001)が熱帯アフリカの*Graphium*属の再検討を行ったが，東洋区では本属の種や亜種の分類学的検討は進んでいない．Page and Treadaway (2014)は東洋区の*eurypylus*種群の再検討を行い，各種内において地理的な変異が非常に多様で複数の新亜種が確認されることから，本グループの安定した分類体系が確立されているとは言い難い．本研究の対象は主に日本産であったが，今後は日本産含めて東洋区全体で包括的に，形態・分子に基づいた分類学的再検討および休眠性や幼虫の植生などの生態的な調査が進めば，本群の進化について興味深い結果が得られると思われる．

結論

筆者らは，日本産ミカドアゲハの2亜種（*albidum*と*perillus*）および近隣の台湾亜種（*postianus*）について，交尾器形態や分子情報に基づいて分類学的再検討を行った．特に，亜種の所属が不確定であった沖縄島産および対馬産について亜種帰属の考察を行った．その結果，2亜種は成虫の斑紋や色彩の相違のみならず，雌雄交尾器もクライン的ではない安定的な形態的差異があること，台湾亜種は八重山亜種に形態的特徴が類似していることが明らかになった．また，分子系統解析によって本土亜種・八重山亜種・台湾亜種はそれぞれ遺伝的にも分化した個体群であることが明らかになった．これらの結果より，沖縄島産は日本本土亜種*albidum*に帰属することが妥当であると考えられた．また，独立亜種*tsushimanum*として扱われることのある対馬産は，本土亜種の地理的変異であると考えられた．

多くの近似種や亜種が東南アジアの熱帯域で繁栄している中，日本本土亜種*albidum*は沖縄島に分布するが基本的には温帯域に限って生息していることから，本亜種は温帯域に適応して異所的に分化した固有の個体群であると推測された．一方，八重山亜種*perillus*も八重山諸島固有の個体群であることが支持された．

Figs 27-38. Male genitalia of *Graphium doson* from Japan and Taiwan. 27, 29, 31, 33, 35, 37: Right valva, inner view. 28, 30, 32, 34, 36, 38: Aedeagus, ventral view. 27, 28: Kochi Pref., Shikoku. 29, 30: Tsushima Island. 31, 32: Okinawa-jima, Okinawa Islands. 33, 34: Iriomote-jima, Yaeyama Islands. 35, 36: Taiwan. 37, 38: Hong Kong, China.

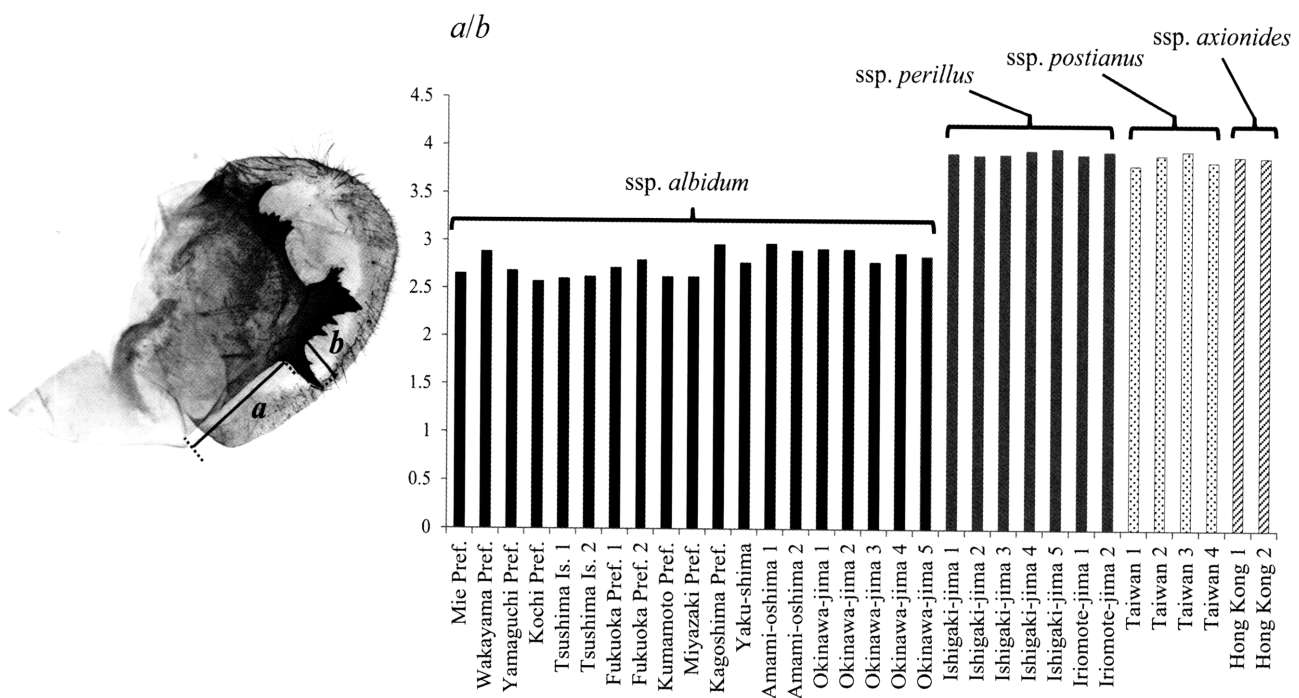
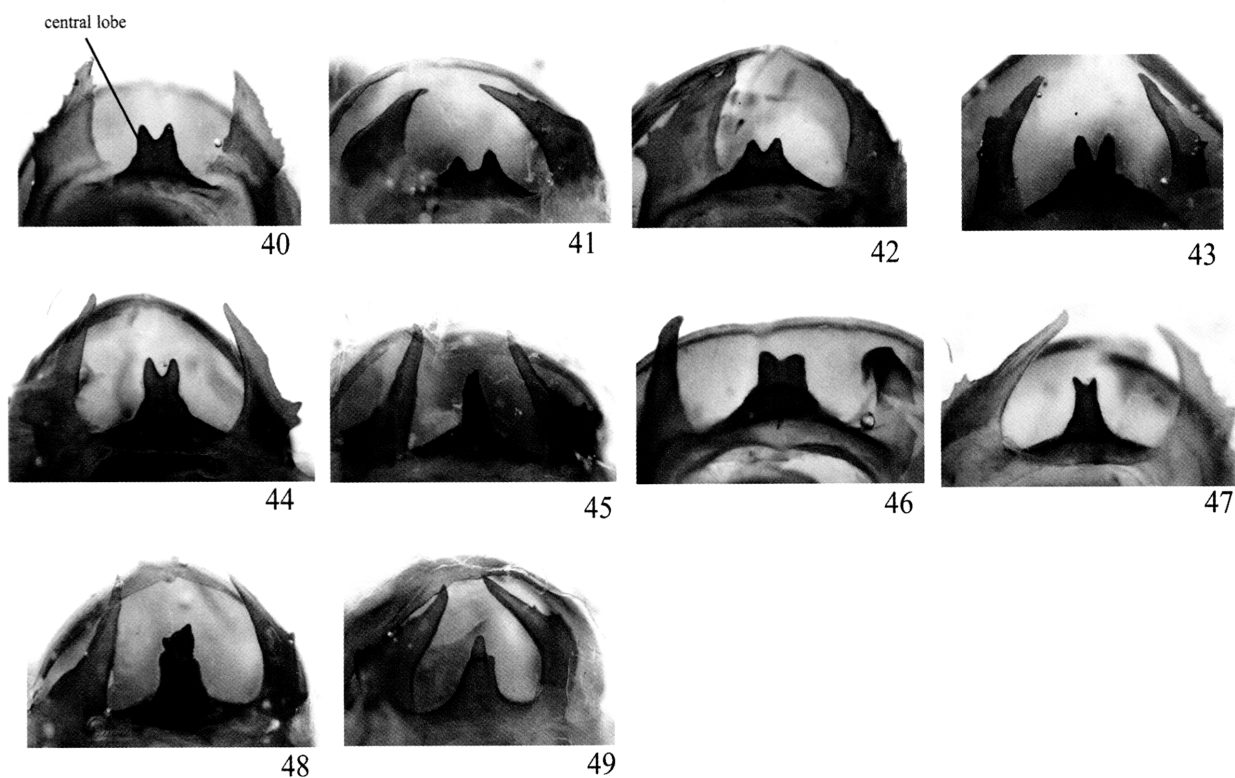



Fig. 39. A bar graph of a ratio of length *a* and *b* of harpe of valva in representative specimens of *Graphium doson* subspecies.

Figs 40-49. Central lobe of the female genitalia of *Graphium doson*. 40. Wakayama Pref., Honshu. 41. Tsushima Island. 42. Amami Ôshima, Amami Islands. 43. Okinawa-jima, Okinawa Islands. 44, 45. Ishigaki-jima, Yaeyama Islands. 46, 47. Iriomote-jima, Yaeyama Islands. 48. Taiwan. 49. Hong Kong (China).

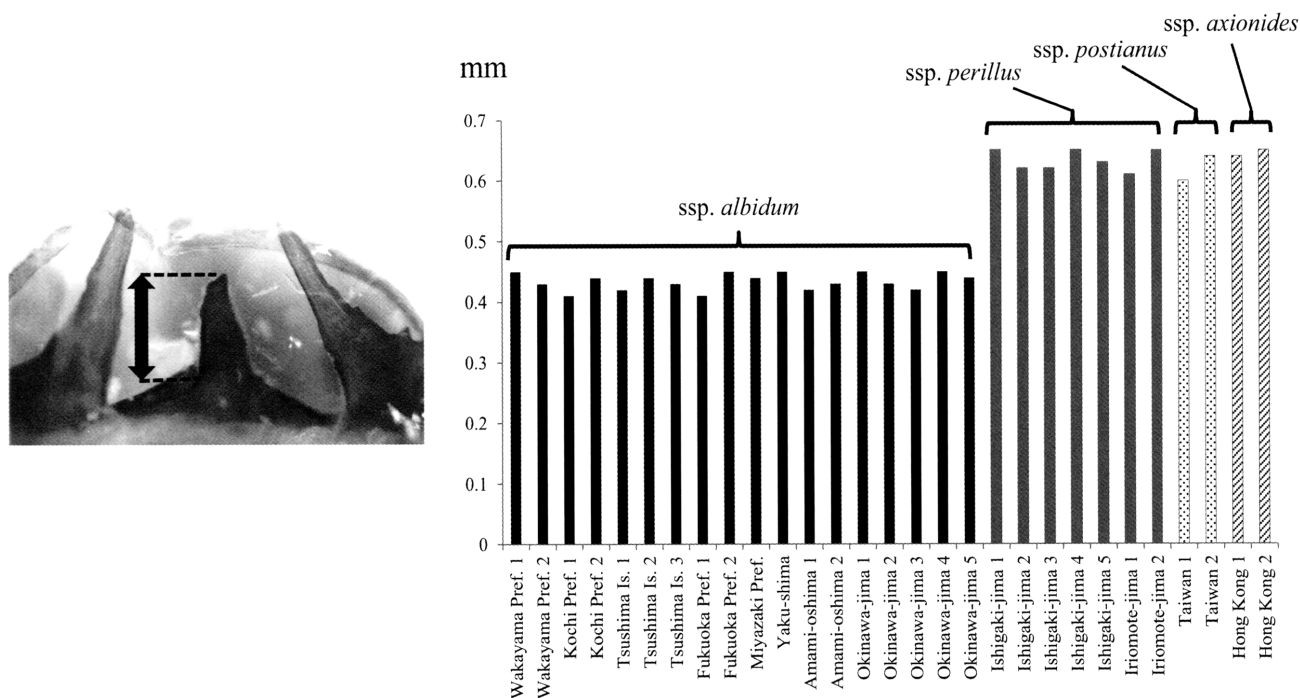



Fig. 50. A bar graph of length of central lobe of female genitalia in representative specimens of *Graphium doson* subspecies.

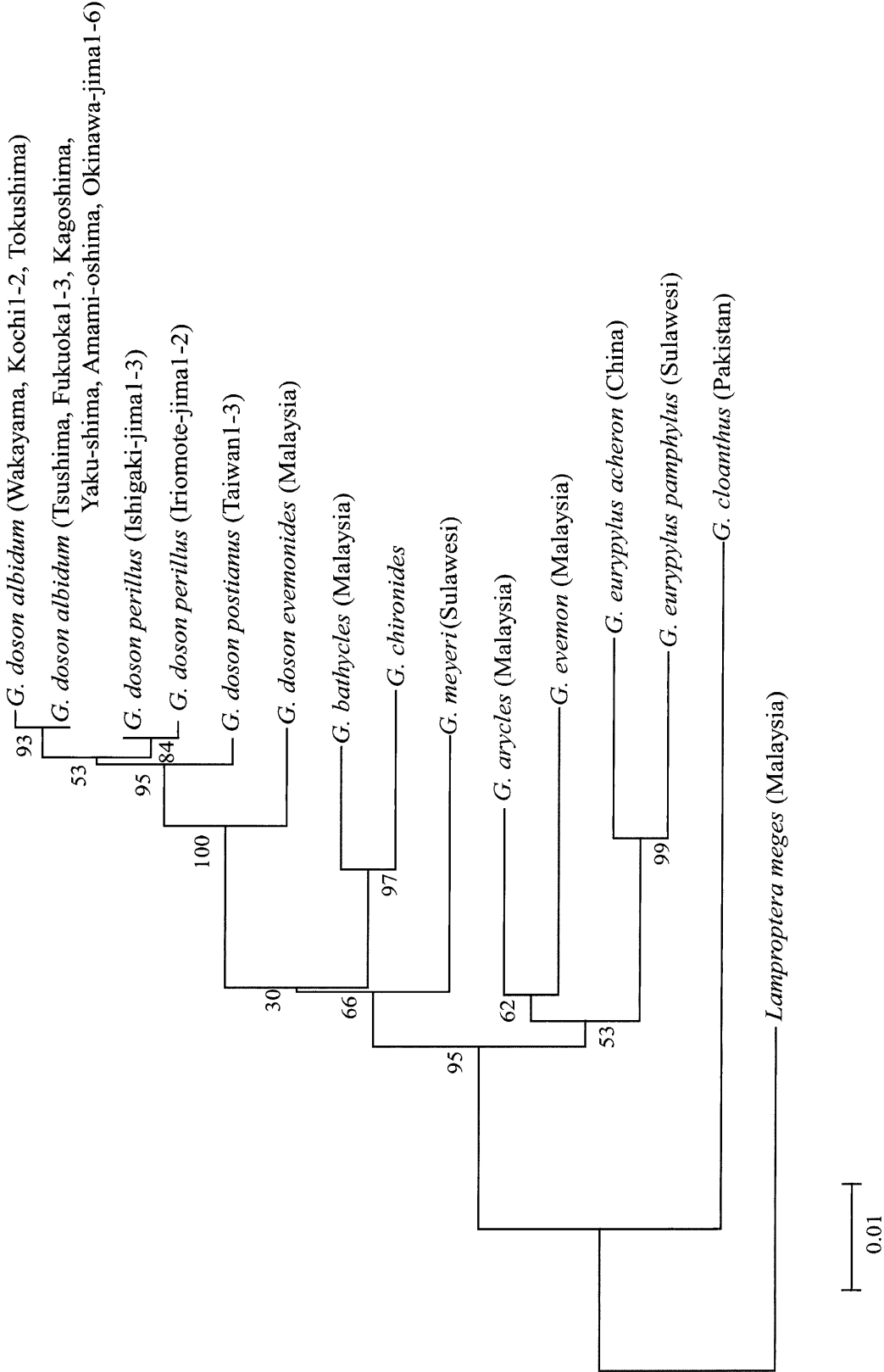



Fig. 51. Neighbor-joining tree of the Oriental *Graphium* species on the basis of 655 bp of mitochondrial *COI* sequences using the program MEGA 5.2. *COI* sequences from two papilionine species, *Graphium cloanthus* and *Lamproptera meges*, were used as outlier sequences. Bootstraps probabilities (10,000 replicates) are provided on each branch.

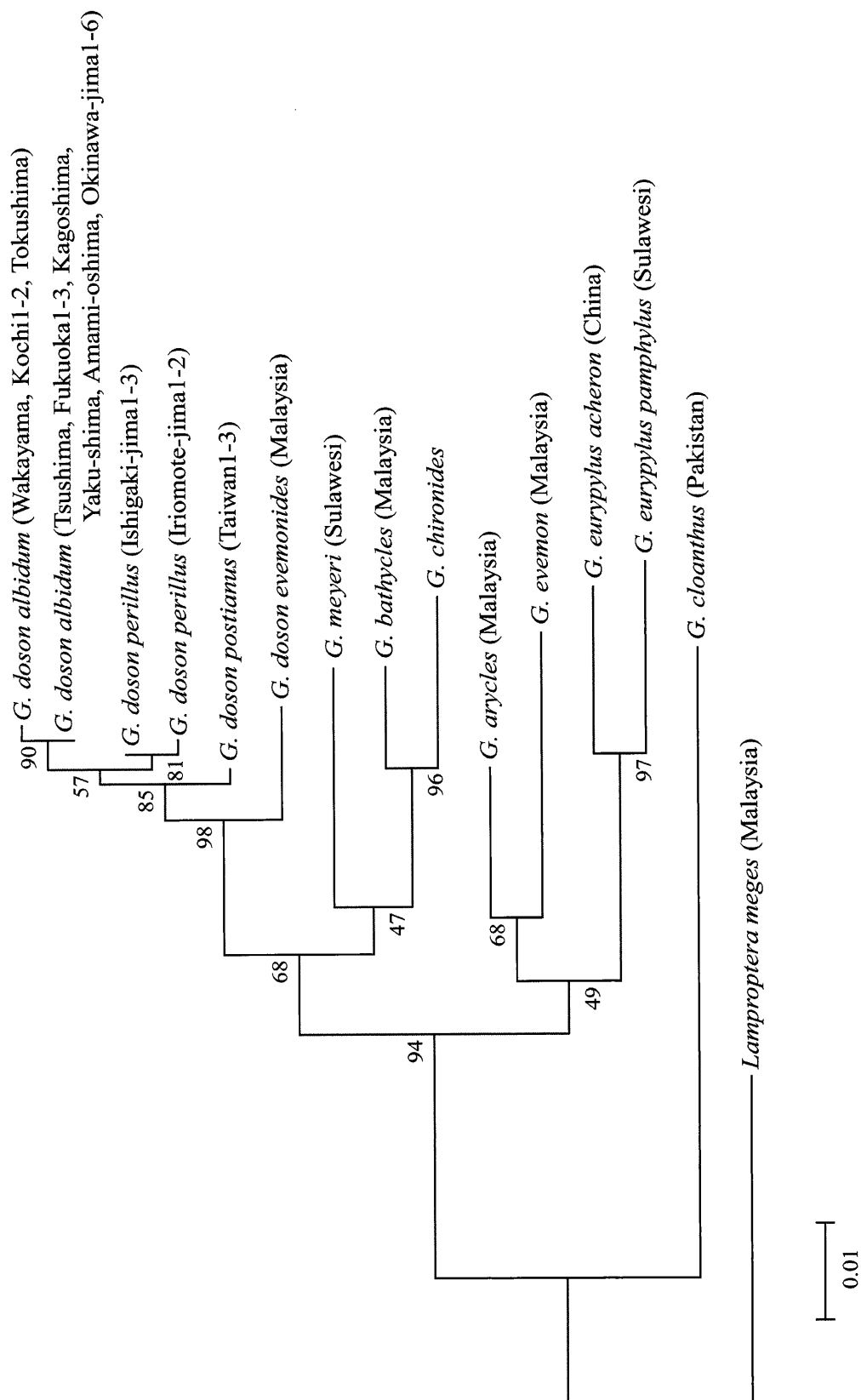



Fig. 52. Maximum-likelihood tree of the Oriental *Graphium* species on the basis of 655 bp of mitochondrial *COI* sequences using the program MEGA 5.2. *COI* sequences from two papilionine species, *Graphium cloanthus* and *Lamproptera meges*, were used as outlier sequences. Bootstraps probabilities (1,000 replicates) are provided on each branch.

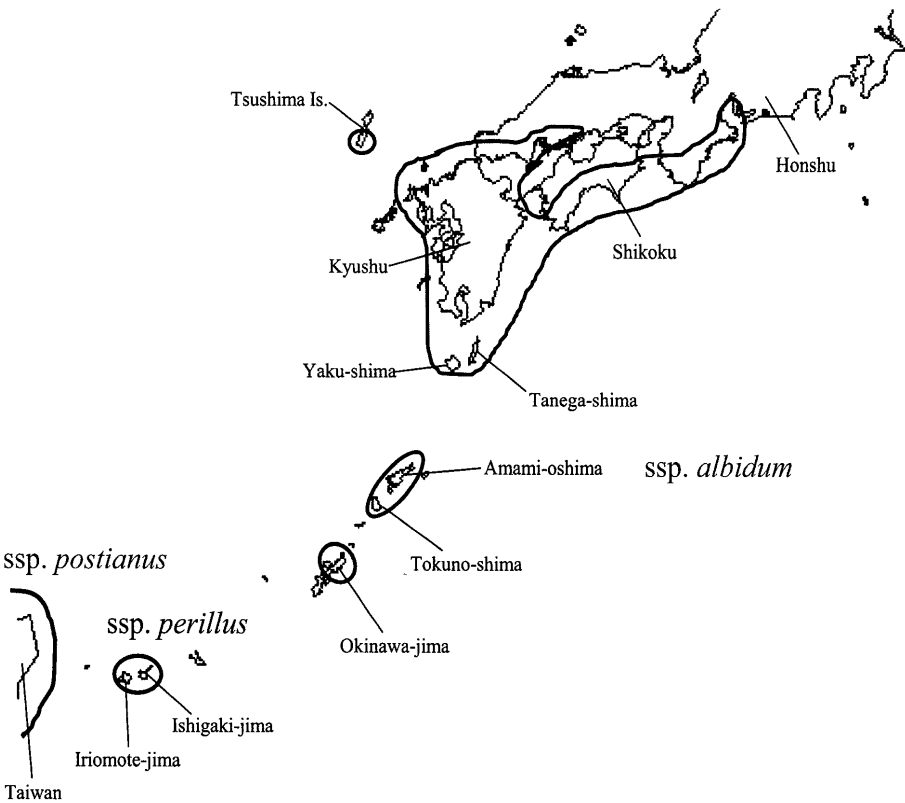



Fig. 53. Distribution map of three subspecies of *Graphium doson* in Japan and Taiwan.

Table 2. Ecological and morphological characters of Japanese *Graphium doson*.

	Graphium doson albidum	***Graphium doson perillus***
Distribution	South Honshu, Shikoku, Kyushu, Tsushima Island, Yaku-shima, Tanega-shima, Amami Islands and Okinawa-jima	Ishigaki-jima, Iriomote-jima, Yaeyama Islands
Main larval food plants*	*Michelia compressa* and *Magnolia grandiflora*	*Michelia compressa* var. *formosana*
Wing**		
Color of markings	Yellowish white to blue-green	Blue-green
Four spots in discal cell	Spot [5] slightly distant from spots[4]~[2]	Equidistant among spots
Submarginal posterior spot in cell 1b	Slightly developed	Developed
Red (yellow) markings on the hindwing underside	Broad (Except Tsushima Islands)	Narrow
Genitalia		
Venral harpe (♂)	Projected	Slightly projected
Apex of aedeagus (♂)	Slightly curved	Straight
Central lobe (♀)	Slightly elongate	Elongate

* After Fukuda (2012)
** After Nobayashi (1998)

謝辞

本稿の作成にあたり，九州大学の三枝豊平名誉教授には研究方法ならびに論文の記述内容について重要な助言をいただいた．また，九州大学・鹿児島大学の湯川淳一名誉教授，大阪府立大学大学院生命環境科学研究科の石井　実教授および池内　健氏，九州大学大学院農学研究院の紙谷聡志准教授には有益な助言をいただいた．大阪府立大学大学院生命環境科学研究科の平井規央准教授，九州大学総合研究博物館の丸山宗利助教，九州大学大学院生物資源科学学府の金　旺奎氏にはDNA解析のご協力をいただいた．東京大学総合研究博物館の勝山礼一朗氏には文献収集にご協力いただいた．九州大学農学部の山口大輔氏，九州大学大学院比較社会文化研究院の阿部芳久教授，荒谷邦雄教授，小田切顕一博士，九州大学持続可能な社会のための決断科学センターの細谷忠嗣准教授，九州大学大学院システム生命科学府の山口　諒氏，大阪府立大学大学院生命環境科学研究科の小林茂樹博士，徳島県立博物館の山田量崇博士，華南農業大学の王　敏教授，また，宮　敏雄氏，渡辺　力氏，渡辺和代氏，新田敦子氏，新田　智氏，岩橋順一郎氏，小原洋一氏，小原みね子氏，入野祐史氏，熊谷信晴氏，柏原精一氏，里中正紀氏，諏訪隆司氏，溝部忠志氏，川上太朗氏には標本提供および標本調査にご協力いただいた．これらの方々に心よりお礼申し上げる．本研究はJSPS科研費・基盤(C)（Nos 23570111, 26440207）により一部助成されている．

引用文献

青木俊明・山口就平・植村好延，2009．琉球列島に固有のチョウ．やどりが (220): 47-60.

東　清二・金城政勝・木村正明，2002．LEPIDOPTERA チョウ目（鱗翅目）．東　清二（監），屋冨祖昌子ら（編），琉球列島産昆虫目録増補改訂版：397-465．沖縄生物学会，沖縄．

東　清二, 2005．昆虫類．沖縄県文化環境部自然保護課（編），改訂・沖縄県の絶滅のおそれのある野生生物（動物編）—レッドデータおきなわ—：286．沖縄県文化環境部自然保護課，沖縄．

Brown, J. M., O. Pellmyr, J. N. Thompson and R. G. Harrison, 1994. Phylogeny of Greya (Lepidoptera: Prodoxidae) based on nucleotide sequence variation in mitochondrial cytochrome oxidase I and II: Congruence with morphological data. *Mol. Biol. Evol.* **11**: 128-141.

Folmer, O., M. Black, W. Hoeh, R. Lutz and R. Vrijenkoek, 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biot.* **3**: 294-299.

福田晴夫，2012．野外飼育による日本列島におけるミカドアゲハの周年経過の再検討．*Butterflies-T* (61): 23-34.

藤岡知夫, 1972．図説日本の蝶．272 pp．ニューサイエンス社，東京．

藤岡知夫，1975．日本産蝶類大図鑑．312 pp., 142 pp., 137 pls．講談社，東京．

藤岡知夫，1981．改訂増補日本産蝶類大図鑑．329 pp., 163 pp., 152 pls. 講談社，東京.

藤岡知夫，1997．第2編アゲハチョウ科. 藤岡知夫編, 日本産蝶類および世界近縁種大図鑑I．Pp. 139-261, pls. 12-162. 出版芸術社，東京.

濱田　康，2010．高知県におけるミカドアゲハの5化観察．*Butterflies-F* (51): 30-31.

日高敏隆，1984．フィールド図鑑チョウ．221 pp．東海大学出版会，東京．

蛭川憲男，2013．日本のチョウ成虫・幼虫図鑑．223 pp．メイツ出版，東京．

猪又敏男，1986．大図録日本の蝶．499 pp. 竹書房，東京．

猪又敏男，1990．原色蝶類検索図鑑．223 pp．北隆館，東京．

猪又敏男・松本克臣，1995．山渓フィールドブックス⑪蝶．255 pp．山と渓谷社，東京．

猪又敏男・植村好延・矢後勝也・神保宇嗣・上田恭一郎，2013. セセリチョウ上科—アゲハチョウ上科．日本昆虫目録編集委員会編，日本昆虫目録，第7巻鱗翅目第1号．xxv, 119pp. 日本昆虫学会，東京．

加藤義臣・山田弘生，2010．アオスジアゲハ属のチョウの翅における青色ビリン色素．蝶と蛾 **61**: 256-262.

川副昭人・若林守男, 1976．原色日本蝶類図鑑．422 pp. 保育社，大阪．

Makita, H., T. Shinkawa, K. Kondo, L. Xing and T. Nakazawa, 2003. Phylogeny of the *Graphium* butterflies inferred from nuclear *28S r*DNA and mitochondrial *ND5* gene sequences. *Trans. lepid. Soc. Japan* **54**: 91-110.

野林千枝，1998．沖縄島・ミカドアゲハのいる風景とその生態と斑紋．昆虫と自然 33 (1): 11-17.

Page, M. G. P and C. G. Treadaway, 2014. Revisional notes on the *Arisbe eurypylus* species group (Lepidoptera: Papilionoidea: Papilionidae). *Stuttgarter Beiträge zur Naturkunde A, Neue Serie* 7: 253–284.

Parsons, M., 1998. The Butterflies of Papua New Guinea: their systematics and biology. xvi, 736 pp., XXVI, 136 pls. Academic Press, London.

三枝豊平，2003．アオスジアゲハ属*Graphium*の系統学と生物地理学．昆虫と自然 **38** (7): 13-17.

三枝豊平・中西明徳・嶌　洪・矢田　脩，1977．*Graphium*亜属の系統と生物地理．蝶 **1**: 2-32.

Saigusa, T., A. Nakanishi, H. Shima and O. Yata, 1982. Phylogeny and geographical distribution of the swallow-tail subgenus *Graphium* (Lepidoptera: Papilioninae). *Ent. Gen.* **8**: 59-69.

里中正紀, 2014．九州, 南西諸島, 台湾にすむ蝶類の分布パターンと地理的変異，そこから推測される生態の考察．やどりが (242): 2-11.

白水　隆，1960．原色台湾蝶類大図鑑．481 pp. 保育社，大阪.

白水　隆，1965．原色図鑑日本の蝶．265 pp. 北隆館，東京．

白水　隆，2006．日本産蝶類標準図鑑．336 pp. 学研，東京．

スミス・キャンベル，2006．我々はなぜ東洋区のアオスジアゲハ属*Graphium*を研究するのか？昆虫と自然 **41** (1): 10-14.

Smith, C. R. and R. I. Vane-Wright, 2001. A review of the afrotropical species of the genus *Graphium* (Lepidoptera: Rhopalocera: Papilionidae). *Bull. Br. Mus. Nat. Hist. (Ent.)* **70** (2): 503-719.

Tamura, K. D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei and S.

Kumar, 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molec. Biol. Evol.* **28**: 2731-2739.
塚田悦造・西山保典, 1980. 図鑑東南アジア島嶼の蝶. 第1巻, アゲハチョウ編. 459 pp. プラパック, 東京.
矢田 脩, 2007. ミカドアゲハ. 矢田 脩 (編), 蝶蛾篇. 新訂原色昆虫大圖鑑 1: 5-6. 北隆館, 東京.
Wilson, J. J., K. W. Sing and M. Sofian-Azirun, 2013. Building a DNA barcode reference library for the true butterflies (Lepidoptera) of Peninsula Malaysia: What about the subspecies? *PLoS ONE*. Published online: 25 NOV 2013; DOI: 10.1371/j.0079969.

Summary

The Japanese population of *Graphium doson* (C. Felder & R. Felder, 1864) consists of two subspecies, *Graphium doson albidum* (Wileman, 1903) from the main Japanese islands including the Amami Islands, and *Graphium doson perillus* (Fruhstorfer, 1908) from the Yaeyama Islands of the Ryukyus. The two subspecies differ from each other in morphological and ecological characters. However, the subspecific characters of the Okinawa-jima population hitherto have not been fully investigated and its subspecific assignment is not unequivocally determined. In addition, although the population of Tsushima Island has been regarded as an independent subspecies *tsushimanum* Fujioka, 1981 based on the wing markings, this treatment seems to be still controversial.

In the present study, the color and pattern of wing markings and the male and female genitalia of the Japanese subspecies, Taiwanese *Graphium doson postianus* and Chinese *Graphium doson axionides* were examined. The morphological characters of specimens from Okinawa-jima and Tsushima Island agreed with *albidum* and those of *perillus* are similar to *postianus* and *axionides*. The larval host plants of the two Japanese subspecies are different. *G. d. albidum* feeds on *Michelia compressa* and *Magnolia grandiflora*, whereas *perillus* feeds on *Michelia compressa* var. *formosana*. In addition, genetic variation of the Japanese *G. doson* subspecies and Taiwanese *postianus* were analyzed based on a partial sequence of the *COI* region (655 bp) of *mt*DNA (DNA barcodes region). Over the whole range of Oriental *Graphium* species, genetic clusters of each species and subspecies were recognized in the results of Neighbor-joining and Maximum-likelihood trees. It was revealed that the subspecies of Japanese *G. doson* and *postianus* from Taiwan are differentiated genetically. The DNA barcodes region of the populations of Okinawa-jima and Tsushima Island resided in the genetic clusters of *albidum*. Thus, we concluded that the populations of Okinawa-jima and Tsushima Island should be assigned to *albidum*. The present results also indicated that it is possible to discriminate the two Japanese subspecies and the Taiwanese subspecies based on the genital morphology and the DNA barcoding.

It is suggested that *G. doson albidum* is a special population occurring from southern Honshu to Okinawa-jima specialized in the warm-temperate zone of Japan, and that this subspecies is a unique and precious population subsisting only in the evergreen broad-leaved forests in southern Japan. In addition, *G. doson perillus* is also considered as an endemic population occurring only in the Yaeyama Islands.
(Received May 20, 2014. Accepted February 4, 2015)